

文章编号:1005-6947(2008)09-0923-03

· 简要论著 ·

# 急性胰腺炎患者 HSP70 与 iNOS 的表达

徐海帆<sup>1</sup>, 罗加兴<sup>2</sup>

(南华大学附属第一医院 1. 肿瘤外科 2. 普通外科, 湖南 衡阳 421001)

**摘要:**目的 探讨急性胰腺炎胰腺组织中热休克蛋白 70 (HSP70) 和诱生型 NO 合成酶 (iNOS) 的表达及其与急性胰腺炎的关系。方法 取 5 例急性胰腺炎以及 5 例外伤胰腺破裂患者的胰腺组织, 提取组织中总 RNA 和蛋白质, 分别用 RT-PCR 和 Western-blotting 检验 HSP70 与 iNOS 在 mRNA 和蛋白质水平的表达。结果 急性胰腺炎患者 HSP70 与 iNOS 的表达水平均明显高于对照组。结论 HSP70 与 iNOS 的过高表达可能与急性胰腺炎有关。 [中国普通外科杂志, 2008, 17(9): 923-925]

**关键词:** 胰腺炎; 热休克蛋白 70; 诱生型 NO 合成酶

**中图分类号:** R 657.5

**文献标识码:** B

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 的主要诱因有胆道蛔虫等引起的梗阻, 长期饮酒<sup>[1]</sup>, 胰腺的小动、静脉急性栓塞、梗阻, 外伤和医源性因素, 感染, 代谢性疾病如高钙血症、高脂血症以及其他因素如药物过敏、药物中毒<sup>[2]</sup>、血色沉着症、肾上腺皮质激素、遗传因素等。然而, AP 在分子水平上的致病机制目前仍不清楚<sup>[3]</sup>。本研究以热休克蛋白 70 (heat shock protein, HSP70) 及诱生型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 为观察指标, 研究 AP 患者胰腺组织中 HSP70 和 iNOS 的表达, 以期了解这两种蛋白质与 AP 发病的关系。

## 1 临床资料与方法

### 1.1 一般资料

收集 2006 年 10 月—2007 年 4 月 5 例 AP 和 5 例外伤胰腺破裂患者的胰腺组织。AP 组男 2 例,

女 3 例, 年龄 (48.89 ± 2.29) 岁; 对照组男 3 例, 女 2 例, 年龄 (47.45 ± 2.31) 岁。两组病例入选条件: (1) AP 组经手术确诊; (2) 对照组均为车祸胰腺破裂者, 无开腹、开胸及开颅等手术史。

### 1.2 试剂

HSP70 mAb 为美国 NEO 公司产品; 反转录试剂盒购自美国 Promega 公司; 蛋白质抽提试剂盒 PRO-PREP 购自赛百盛公司; TRIzol 液购自三泰生物有限公司; 各种 DNA 和蛋白质标记物均购自日本 Takara 公司; 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.3 实验方法

组织细胞总 RNA 抽提和逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 参照文献<sup>[4]</sup>进行。组织蛋白质抽提按试剂盒 PRO-PREP 说明书进行。Western blotting 参照文献<sup>[5]</sup>进行。引物设计见表 1。

表 1 用于 RT-PCR 的引物序列

基因	正向	反向	碱基对 (bp)	基因库
HSP70	5'-taccatgct gggcacag-3'	5'-cttgctcaaacggccctgt-3'	1100	AF352832
iNOS	5'-aggcaaaaatagaggaacat-3'	5'-gatggtcacattctgctt-3'	850	D26525
β-actin	5'-aattggcgctaattgcgcgt-3'	5'-catgccggagcgggtgcga-3'	490	M10277

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 检测结果

AP 胰腺组织中 HSP70 和 iNOS mRNA 水平均显著高于对照组, ( $P < 0.05$ ) (图 1)。

**基金项目:** 湖南省教育厅课题资助 (04C556)。

**收稿日期:** 2007-12-19; **修订日期:** 2008-06-21。

**作者简介:** 徐海帆, 男, 南华大学附属第一医院副教授, 主要从事普外临床与基础方面的研究。

**通讯作者:** 罗加兴 E-mail: ljx729@yahoo.com.cn

## 2.2 Westernblotting 检测结果

AP 组胰腺组织中 HSP70、iNOS 蛋白质的表达

水平显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。

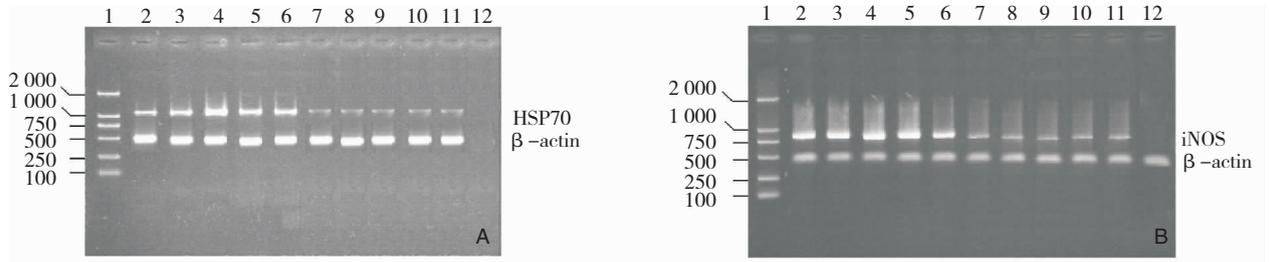


图 1 AP 组和对照组胰腺组织中 HSP70 和 iNOS RT-PCR 检测结果 A: HSP70; B: iNOS; 1: Del 2000; 2~6: AP; 7~11: 对照; 12: (-)

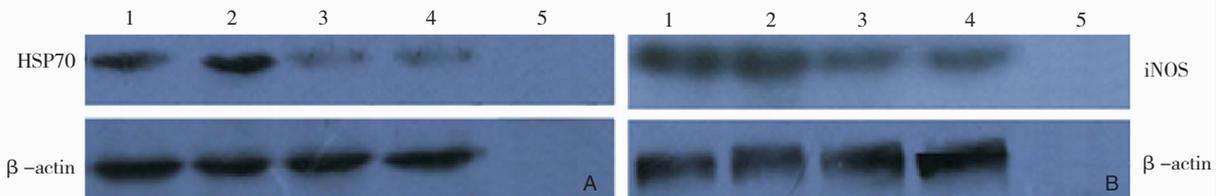


图 2 AP 组和对照组胰腺组织中 HSP70 和 iNOS Westernblotting 检测结果 A: HSP70; B: iNOS; 1~2: AP; 3~4: 对照; 5: (-)

## 3 讨论

HSP 是一组高度保守、与应激相关的蛋白,在细胞正常发育和多种应激状态下对维持细胞的稳定性具有重要作用<sup>[6-7]</sup>。HSP70 作为“分子伴侣”参与蛋白的折叠、转运、转位和生物合成等生理过程<sup>[8]</sup>;应激情况下,HSP70 对损伤细胞具有修复作用<sup>[9]</sup>。Velez Granelln 等<sup>[10]</sup>发现正常胰腺细胞中 HSP70 参与胰酶的折叠和包装,并可能有抑制酶原激活的作用。本研究中,AP 患者的 HSP70 无论是在 mRNA 水平还是蛋白质水平都比对照高。说明 AP 的发生可能会导机体 HSP70 水平增高。但目前尚无充分的证据表明 HSP70 的增高对机体会产生应激性保护作用。

在各种应激状态下,一氧化氮(NO)对改善机体的微循环发挥了非常重要的作用<sup>[11]</sup>。NO 由 NOS 产生,NOS 有两种形式,即  $Ca^{2+}$ -依赖型的原生型 NO 合成酶(constitutive NOS, cNOS)和非  $Ca^{2+}$ -依赖型的诱生型 NO 合成酶(iNOS)。AP 形成初期,NO 主要由 cNOS 产生,起保护作用,表现为维持微循环的完整性<sup>[12]</sup>,抑制血小板、白细胞在内皮细胞表面的黏附、集聚,防止血栓形成,从而抑制血管内凝血和实质炎症细胞的浸润<sup>[13]</sup>。

同时它还能抑制重型粒细胞的超氧阴离子的产生,保护内皮细胞免受自由基的损伤。但随着 AP 患者病情的加重,iNOS 水平显著增高,并在 36~48h 达到最高峰。本研究结果显示,AP 患者的 iNOS 在 mRNA 水平和蛋白质水平也比对照高。

以前认为,AP 造成患者死亡的主要原因是胰腺坏死。因此,临床上主张尽早使用手术如广泛的胰腺坏死组织切除、全胰腺切除等以清除坏死的胰腺组织。随后多年的临床研究及动物实验发现,AP 造成患者死亡的主要原因是胰腺组织坏死引起继发感染导致多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)及全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),而非胰腺本身。对其治疗若采用扩大的手术方法非但不能阻止胰腺组织坏死感染,反而会加重感染<sup>[14]</sup>。按不同病因及不同病程处理的“综合治疗方案”目前已基本形成了;非手术治疗方法也进一步完善,其中改善微循环在非手术治疗 AP 中起重要作用。有研究显示,HSP70 抑制 iNOS 的表达,从而对胰腺细胞起保护作用<sup>[15]</sup>。然而,本研究中 HSP70 与 iNOS 的表达都同时增高,可以推测,HSP70 对 iNOS 的抑制作用可能存在时间效应关系。因此,研究不同时点

HSP70 与 iNOS 的关系及其与 AP 病程的关系,可望为改善 AP 加重期所导致的胰腺出血、坏死,预测 AP 的预后,以及寻找新的药物作用靶点及临床检测指标提供参考。

#### 参考文献:

- [1] Yadav D, Lowenfels AB. Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review [J]. *Pancreas*, 2006, 33(4):323-330.
- [2] Sekimoto M, Takada T, Kawarada Y, *et al.* JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, natural history, and outcome predictors in acute pancreatitis [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2006, 13(1):10-24.
- [3] Nishimori I, Onishi S. Role of apoptosis in severe acute pancreatitis [J]. *Nippon Rinsho*, 2004, 62(11):2021-2026.
- [4] Barbaric D, Dalla-Pozza L, Byrne J A, *et al.* A reliable method for total RNA extraction from frozen human bone marrow samples taken at diagnosis of acute leukaemia [J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(11):865-867.
- [5] Lee C. Protein extraction from mammalian tissues [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 362:385-389.
- [6] 程应东,梁平,张朝军,等. HSP70 基因转染对大鼠脓毒症早期外周血细胞因子的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 12(3):212-215.
- [7] Rafiee P, Shi Y, Pritchard KA Jr, *et al.* Cellular redistribution of inducible Hsp70 protein in the human and rabbit heart

in response to the stress of chronic hypoxia: role of protein kinases [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(44):43636-43644.

- [8] Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell [J]. *Nature*, 1992, 355(1):33-45.
- [9] William JW. How cells responds to stress [J]. *Scientific American*, 1993, 5(1):34-41.
- [10] Vélez Granell CS, Arias AE, Torres Ruíz JA, *et al.* Molecular chaperones in pancreatic tissue: the presence of hsp10, hsp60 and hsp70 in distinct compartment along the secretory pathway of the acinar cell [J]. *J Cell Sci*, 1994, 107(Pt3):539-549.
- [11] Marber MS, Mestril R, Chi SH, *et al.* Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury [J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(4):1446-1456.
- [12] Nishino T, Watanabe S, Oyama H, *et al.* An endothelial nitric oxide synthase inhibitor aggravates LDL induced acute pancreatitis in rats [J]. *Pancreas*, 1999, 19(4):390-400.
- [13] Liu X, Nakano I, Yamaguchi H, *et al.* Protective effect of nitric oxide on development of acute pancreatitis in rats [J]. *Dig Dis Sci*, 1995, 40(10):2162-2169.
- [14] 孙家邦,朱斌. 爆发性胰腺炎的诊断及治疗 [J]. *中国实用外科杂志*, 2004, 24(1):23-24.
- [15] Weber H, Wagner A C, Jonas L, *et al.* Heat shock response is associated with protection against acute interstitial pancreatitis in rats [J]. *Dig Dis Sci*, 2000, 45(1):2252-2264.

## 欢迎参加中美国际肝胆胰外科学术论坛

湖南省医学会肝胆外科学专业委员会与中国普通外科杂志社联合举办、湖南省人民医院承办“中美国际肝胆胰外科学术论坛”将于2008年11月14日—18日(14日全天报到)召开,地点:湖南省长沙市新华大酒店(总台0731-4308615)。这次会议诚邀美国及中国港澳台知名专家就“肝胆胰外科疾病”这一主题进行深入的学术论坛与交流。学术内容:(1)肝胆胰肿瘤诊治新进展;(2)难治性胆石病的诊治策略;(3)重症胰腺炎的诊治新进展;(4)门静脉高压症的诊断与治疗;(5)医源性胆道损伤的预防与诊治策略;(6)器官移植与细胞移植新进展;(7)微创外科新进展;(8)介入治疗在肝胆外科中的应用;(9)围手术期营养支持治疗;参会代表授予国家级I类继续医学教育学分10分。联系人:湖南省人民医院周海峰 邮编:410005 电话:0731-2278292,2278158 E-mail:zhf85268@163.com